(Aus der Universitätskinderklinik Basel [Direktor: Prof. Dr. E. Freudenberg].)

Ueber das Verhalten der Phosphatase in den Erythrocyten bei Anämien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der hohen Medizinischen Fakultät der Universität Basel

Vorgelegt von

Ursula Rust-Brunner

Walchwil / Zug

1944

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Professor Freudenberg

Tag der Promotion: 10. Juni 1943

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Sonderdruck aus ANNALES PAEDIATRICI, Vol. 162, No. 1

(Aus der Universitätskinderklinik Basel [Direktor: Prof. Dr. E. Freudenberg].)

Über das Verhalten der Phosphatase in den Erythrocyten bei Anämien.

Von URSULA RUST-BRUNNER.

I. Einleitung.

Im Jahre 1935 wurde von *E. Freudenberg* festgestellt, daß bei Anämie die Phosphorsäure-Ester im Gesamtblut vermindert sind. Spätere Untersuchungen zeigten, daß die Phosphorsäure-Ester bei Anämie wohl total vermindert, auf den einzelnen Erythrocyten umgerechnet jedoch erhöht sind *(Stearns* und *Warwey, B. Kinzel).* Die letztgenannte Autorin fand unter der Leitung des Erstgenannten die Erhöhung der Ester außer bei klinischen Anämien auch bei Phenylhydrazinanämie und Oelsäureanämie des Kaninchens, nicht jedoch bei der Aderlaßanämie des Kaninchens. Am Menschen war ein Parallelismus zum Reticulocytenanstieg weniger deutlich als im Tierversuch. Nach der Theorie von *E. Freudenberg* stellt die Ester-Phosphorsäure das Depot für den Spiegel des anorganischen Phosphats im Blute dar, wobei durch pH-Verschiebungen und Anionen-Austausch der An- und Abbau unter Einwirkung der Phosphatase reguliert wird. Die Vermehrung der Ester-Phosphorsäure im einzelnen Erythrocyt bei Anämien würde somit die durch die kleine Zahl von roten Blutkörperchen entstandene Verminderung des gesamten Depots verhältnismäßig ausgleichen. Es interessierte uns zu untersuchen, wie sich die Erythrocyten-Phosphatase bei diesen Zuständen verhält.

Phosphatasen sind Enzyme, welche esterartig gebundene Phosphorsäure aus organischen Verbindungen abspalten. Sie kommen in jeder Zelle vor. Im Blut sind zwei Typen von Phosphatase streng zu unterscheiden:

1. Die «saure» Phosphatase der Erythrocyten mit optimalem Wirkungsgrad bei pH = 5—6.
2. Die «alkalische» Phosphatase des Serums mit optimalem Effekt bei pH = 9.

Die «saure» Phosphatase findet man auch in verschiedenen Organen (wie Niere, Leber, Knochen). Sie soll nach der Meinung von *Waldschmidt-Leitz* ausschließlich aus den roten Blutkörperchen entstammen und im Organismus sonst nur sekundär enthalten sein. Nach *Bamann* ist die «saure» Phosphatase ein Enzym der Organe selbst.

Die «alkalische» Phosphatase wird als eigentliche Gewebsphosphatase bezeichnet und scheint nur ein aus verschiedenen Organen (hauptsächlich Leber und Knochen) abgegebenes Enzym zu sein. Sie ist von fermentchemischer und klinischer Seite eingehend untersucht worden.

Vorliegende Arbeit behandelt ausschließlich das Verhalten der «sauren» Erythrocyten-Phosphatase, die im Gegensatz zur Serum-Phosphatase noch wenig untersucht und namentlich nicht in ihrer klinischen Bedeutung gewürdigt worden ist.

II. Methodik.

1. Gang der Untersuchung.

2 ccm frisch entnommenes, mit Vetren gut gemischtes und mit Luft geschütteltes Blut werden mit 0,4 ccm n/5 Na-Acetat-Essigsäurepuffer (pH = 5,7) versetzt. Das resultierende pH liegt bei 6,8—7,0. *Roche* gibt eine Verschiebung des optimalen pH für rote Blutkörperchen auf 6,6—6,8 an, wenn Substrate mit 2 Phosphorsäure-Molekülen verwendet werden. Bei gewöhnlichen Substraten (Monophosphorsäure-Ester) wird das pH bei 5,8—6,4 als optimal angenommen. Nach *Jost* bestehen die säurelöslichen Phosphorverbindungen in den Erythrocyten zu 75—80% aus Diphosphoglycerinsäure. Das relativ hohe pH in unseren Versuchen ist daher für das «natürliche» Substrat in den roten Blutkörperchen gerechtfertigt. Wir haben kein weiteres Substrat zugesetzt und die Blutkörperchen möglichst schonend zu behandeln getrachtet. Damit ist der große Vorteil verbunden, daß unter annähernd physiologischen Bedingungen gearbeitet wird.

Es wird sofort nach der Blutentnahme der anorganische Phosphorgehalt im Vollblut bestimmt. Hierbei ist die Verdünnung durch den Pufferzusatz rechnerisch zu berücksichtigen. Die Erythrocyten werden gezählt und eventuell das Hämoglobin gemessen. Das mit Puffer versetzte Blut wird dann in einem mit Korkstopfen verschlossenen Gläschen für 4 Stunden in den Brutschrank von 38° gestellt. Nach dieser Zeit wird wieder der Gehalt an anorganischem Phosphor bestimmt. Entscheidend ist die Differenz zwischen dem Vierstunden-Wert und dem anfänglichen Phosphorwert. Daraus kann die Phosphor-Zunahme pro einzelnen Erythrocyt ausgerechnet werden.

2. Bestimmung des anorganischen Phosphats.

stufenphotometrisch nach *Ernst Müller*.

3. Fehlergrenzen und Fehlerquellen.

a) Durch Doppelversuche (s. in den Tab. 1 und 2) wurde festgestellt, daß das Resultat bis $0{,}1 \times 10^{-11}$ mg Phosphor pro Erythrocyt differieren kann. Die Phosphorbestimmungen sind bei Doppelversuchen mit gleichem Material im Mittel auf $\pm 2\%$ genau zu erheben. Da jedoch die Differenz zwischen 2 Phosphor-Bestimmungen maßgebend ist und diese Zahl durch die relativ weniger genau bestimmbare Erythrocytenzahl dividiert werden muß, vergrößert sich der Fehlerausschlag.

b) Das Blut muß möglichst *frisch* untersucht werden. 3—4stündiges Stehen im Eiskasten verändert das Resultat noch nicht. Ist das Blut aber 1—2 Tage im Eiskasten gestanden, so ist die Phosphor-Zunahme stark vermehrt (s. Tabelle 4), was einerseits auf Milchsäurebildung durch Glykolyse, andererseits auf autolytische Strukturveränderungen im Erythrocyten, die die Phosphatase loslösen und ihre Aktivierbarkeit erhöhen, zurückgeführt werden dürfte.

c) Längeres Stehen des Trichloressigsäure-Filtrates erhöht den Phosphor-Wert. Zum Beispiel

sofort untersucht 6,25 mg%
nach 24 Stunden 7,10 mg%
nach 48 Stunden 7,61 mg%

Bei der üblichen Arbeitsweise kommt diese Fehlerquelle nicht in Betracht. Der Arbeitsgang darf aber keine längere Unterbrechung erfahren.

d) In der Zeitschrift für Kinderheilkunde (63. Bd., 4. Heft, 1942) erschien eine Arbeit von *Göbell* und *Janda*, betitelt: «Normale Werte für Kreatinphosphorsäure im Blut». Die Verfasser kommen zum Resultat, daß 66,1%, bei Säuglingen sogar 70,4% des sogenannten anorganischen Phosphates aus Kreatinphosphorsäure bestehe. Sie finden, daß das «wahre anorganische Phosphat» in allen Lebensaltern ziemlich konstant sei, und daß das bekannte Absinken des P-Spiegels vom Säugling zum Erwachsenen im wesentlichen ein Abfallen der Kreatinphosphorsäure sei. Auch peroral verabreichtes Phosphat werde im Blut sofort zum größten Teil an Kreatin gebunden. Dies veranlaßte uns zu untersuchen, ob die Phosphatzunahme in unseren Versuchen nicht etwa auf einer Bildung von Kreatinphosphorsäure beruhe. *Göbell* geht von der bekannten Tatsache aus, daß die Kreatinphosphorsäure in saurem Milieu rasch hydrolysiert wird. Er benutzt die von *Lohmann* für Muskelbrei angegebene Methode und wendet sie auf das Blut an. Er fällt das Blut mit nur 5%iger Trichloressigsäure *unter Eiskühlung* und filtriert möglichst rasch. In der Annahme, daß die Kreatinphosphorsäure dann nicht aufgespalten ist, wird das «wahre anorganische Phosphat» mit Magnesiumcitrat-Lösung gefällt, der gewaschene Niederschlag in Ammonmolybdat-Lösung gelöst und der Phosphor-Gehalt bestimmt. Der Phosphagen-Wert ermittelt sich aus der Differenz des nach der «gewöhnlichen Methode» für anorganischen Phosphor gefundenen Wertes (in der obigen Arbeit nicht speziell aufgeführt) und des «wahren anorganischen Phosphat»-Wertes.

Zu unseren Versuchen wurde vor allem Nabelschnurblut verwendet, weil da die Ausschläge am ausgeprägtesten erwartet werden dürfen. Zunächst interessierte uns die Frage, inwieweit die Eiskühlung bei der Trichloressigsäure-Fällung eine Differenz des Phosphor-Wertes ausmacht. (Die Konzentration der Trichloressigsäure ist annähernd dieselbe unter den gegebenen Bedingungen, indem die 20%ige Trichloressigsäure nach unserer Methode von *E. Müller* auf 4% verdünnt wird, die 5%ige nach der Methode von *Göbell* auf 3%.) *Es wurde keine deutliche Differenz gefunden, wenn mit Eis gekühlt wurde. Die Werte liegen in der Fehlergrenze der ohne Eiskühlung erhaltenen!*

Der Versuch, das «wahre anorganische Phosphat» nach *Göbell* zu bestimmen, scheiterte bei uns an der Unlösbarkeit der mikroskopisch kleinen Magnesium-Ammonium-Phosphat-Kriställchen in Molybdat-Lösung. Wir umgingen diese Schwierigkeit, indem wir die Kreatinphosphorsäure nach mehrstündiger Hydrolyse derselben mit 20%iger Trichloressigsäure direkt im Filtrat bestimmten. Wir fanden Werte um 1 mg% Phosphor, was prozentual nur ca. 20% Kreatinphosphorsäure von 4 mg% anorganischem Phosphor ausmacht, anstatt 70% nach *Göbell*. Wir wiederholten die Kreatinphosphorsäure-Bestimmung nach 4stündiger Inkubation des Blutes im Brutschrank und fanden wieder den gleichen Wert der Kreatinphosphorsäure. Was wir in unsern Messungen an P-Zunahme ermittelt haben, ist also keine Kreatinphosphorsäure, sondern es wird wirkliches anorganisches Phosphat gebildet, wie dies ja der Tätigkeit einer Phosphatase entspricht.

Bei 4 mg% Phosphor im Nabelschnur-Vollblut müßten, wenn wirklich 70% davon an Kreatin gebunden wären, ca. 12 mg% Kreatin nur von der Kreatinphosphorsäure her gefunden werden können. Diese rechnerische Ueberlegung führte uns dazu, das Kreatin im Nabelschnurvollblut zu untersuchen. Wir bestimmten das Kreatin nach *Lieb* und *Zacherl* vor und nach Hydrolyse mit Schwefelsäure (um die Kreatinphosphorsäure sicher zu spalten) und fanden in Uebereinstimmung mit Angaben der Literatur Werte um 4 mg% Kreatin sowohl vor als auch nach der Hydrolyse. Diese Untersuchungen bestärkten uns darin, an den Resultaten von *Göbell* und *Janda* zu zweifeln. Wir vermuten, daß vielleicht die sehr schwere Löslichkeit dieser feinsten Magnesium-Ammonium-Phosphat-Kriställchen von mikroskopischer Größenordnung zu geringe Werte des «wahren anorganischen Phosphats» bewirkte und daß dadurch die Differenz, die der Kreatinphosphorsäure nach der Meinung der Autoren hätte entsprechen sollen, zu groß ausgefallen ist. Auch wäre es interessant, die «allgemein übliche klinische Phosphorbestimmung» von *Göbell* und *Janda* näher zu erfahren, da sie unter Umständen von der unseren abweichen könnte.

III. Resultate.

TAB. 1. Nicht Anämische.

Alter	Name	Diagnose	Erythrocytenzahl Mill.	Hämoglobin g%	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
—	Nabelschnurblut	(lege artis entnommen und sofort untersucht)	4,69	—	6,92	1,5	14. 12. 42
—	Nabelschnurblut	(dito, aber Gerinselbildung)	3,27	—	4,33	1,3	14. 12. 42
—	Nabelschnurblut	(lege artis entnommen und sofort untersucht)	4,82	—	6,85	1,4	31. 12. 42
—	Nabelschnurblut	(lege artis entnommen, 4 Std. bei Zimmertemp. gest.)	4,57	—	4,28	0,9	31. 12. 42
—	Nabelschnurblut	(wurde aus der Nabelschnur leicht ausmassiert)	3,80	—	4,44	1,2	7. 12. 42
—	Nabelschnurblut	dito	3,50	—	3,33	1,0	7. 12. 42
—	Nabelschnurblut	(lege artis entnommen und sofort untersucht)	4,65	14,8	7,00	1,5	11. 3. 43
7 T.	Thieri, Ch.	nach Aspirationspneumonie. Gutes Gedeihen	5,94	22,4	8,37	1,4	10. 2. 43
8 T.	Märki, H.	Frühgeburt Gutes Gedeihen. 2200 g	5,26	18,9	4,20	0,8	5. 3. 43
14 T.	Gasser, K.	Erbrechen im Neugeborenenalter, anschließend gutes Gedeihen	5,67	20,0	4,73	0,8	12. 2. 43
6 W.	Jeannaire	Ammenkind A	4,15	—	2,74	0,7	24. 2. 43
	id.	(Doppelversuch) B	3,94	—	2,17	0,6	24. 3. 43
8 W.	Huber, P.	Spastisches Erbrechen, Dystrophie. Gutes Gedeihen	4,40	18,4	2,21	0,5	25. 11. 42
9 W.	Rahm, P.	Alimentäre Intoxikation in Rekonvaleszenz	4,52	17,6	1,83	0,4	25. 11. 42
9 W.	Kiefer, J.	Habituelles Erbrechen. Gutes Gedeihen	4,10	14,0	2,53	0,6	17. 2. 43
4½ M.	Waltisberg, R.	Rachitis in Rekonvaleszenz und Bronchitis	5,00	—	3,08	0,6	17. 2. 43
4½ M.	Rüegger, B.	Otitis med. purul. dext. heilende Rachitis	4,41	16,0	3,76	0,9	8. 3. 43
5 M.	Wiewille, B.	geheilte Pyurie	4,60	11,8	2,30	0,5	27. 11. 42
7 M.	Meier, J.	Pyurie, heilende Rachitis	3,96	12,6	1,82	0,5	2. 3. 43
7 M.	Stegmüller, K.	Floride Rachitis und Bronchitis	5,25	13,3	2,18	0,4	13. 3. 43
11 M.	Amm, W.	Angina und Exanthema subitum	5,30	—	2,43	0,5	27. 11. 42
13 M.	Fiechter, P.	geheilte Otitis media acuta duplex	5,94	13,3	2,02	0,3	26. 2. 43

Alter	Name	Diagnose	Erythrocytenzahl Mill.	Hämoglobin g%	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
15 M.	Vonlanthen, J.	Rekonvaleszenz nach Dystrophie und Rachitis. Gutes Befinden	4,85	11,5	2,11	0,4	30. 11. 42
1½ J.	Kunz, I.	Tbc pulmonum, mäßig aktiv	4,68	12,8	2,91	0,6	30. 11. 42
1¾ J.	Paul, P.	Rekonvaleszenz nach Nährschaden	4,90	14,7	2,78	0,6	5. 4. 43
2 J.	Brügger, F.	Otitis media duplex, Impetigo	4,50	13,6	1,92	0,4	26. 2. 43
2¼ J.	Heidolf, J.	*Feer*sche Neurose in Abheilung und interkurrente Hepatitis epidem.	4,63	—	1,79	0,4	15. 2. 43
3½ J.	Tanner, E.	Hämorrhag. Scharlach-Nephritis	4,27	13,8	2,23	0,5	3. 3. 43
4 J.	Racine, E.	Rekonvaleszenz nach Pleuropneumonie links	4,25	12,2	2,50	0,6	26. 3. 43
5 J.	Scheidiger, V.	Rekonvaleszenz nach komplikationslosem Scharlach	4,35	—	1,53	0,3	3. 12. 42
5 J.	Brenneisen, B.	Rekonvaleszenz nach Hepatitis epid. und Appendicitis	4,10	—	1,71	0,4	30. 12. 42
5½ J.	Hugh, J.	leichter Scharlach in Rekonvaleszenz	4,79	14,7	1,79	0,4	3. 3. 43
5¾ J.	Suter, A.	Rekonvaleszenz nach Masern	5,32	—	2,56	0,5	2. 12. 42
6 J.	Bruderer, T.	Enuresis nocturna	4,47	13,1	2,13	0,5	1. 12. 42
7 J.	Maitre, R.	Enuresis nocturna	4,67	—	1,29	0,3	2. 12. 42
8⅓ J.	Mohler, E.	Psychopathie A	4,93	13,9	2,56	0,5	2. 3. 43
	id.	(Doppelversuch) B	4,93	—	2,37	0,5	2. 3. 43
8½ J.	Thomas, R.	Rekonvaleszenz nach komplikationslosem Scharlach	4,27	—	0,89	0,2	8. 12. 42
9 J.	Albisetti, L.	Rekonvaleszenz nach komplikationslosem Scharlach	4,44	—	1,41	0,3	3. 12. 42
10 J.	Valentin, M.	Enuresis nocturna	4,30	13,6	3,14	0,7	26. 3. 43
10 J.	Klausegger, G.	geheilte Scharlach-Nephritis	4,25	—	1,81	0,4	2. 3. 43
11 J.	Handschin, R.	Hepatitis epidemica in Rekonvaleszenz	4,35	—	2,28	0,5	1. 3. 43
11½ J.	Stöcklin, R.	Status nach Appendicitis subacuta	5,18	16,5	1,60	0,3	9. 2. 43
12 J.	Stocker, F.	Rekonvaleszenz nach Hepatitis epidemica	4,65	—	1,90	0,4	12. 2. 43

Alter	Name	Diagnose	Erythrocytenzahl Mill.	Hämoglobin g%	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
12 J.	Kunz, A.	Enuresis noct., Zwergwuchs, Hypothyreose	4,44	12,8	1,95	0,4	13. 3. 43
13 J.	Sessa, N.	Coli-Pyelitis in Rekonvaleszenz	4,91	—	1,44	0,3	1. 12. 42
13 J.	Lichtstein, A.	Hypacidität	5,39	—	1,31	0,2	16. 2. 43
13 J.	Travella, A.	Enuresis nocturna	5,06	—	1,96	0,4	16. 2. 43
13 J.	Häfelfinger, S.	nach Status febrilis	4,42	—	3,04	0,7	22. 2. 43
14¾ J.	Jost, M.	Rekonvalesz. nach Scharlach	4,49	—	2,00	0,4	12. 2. 43
27 J.	U. R.	gesund	4,89	—	1,70	0,3	11. 12. 42
30 J.	Dr. M.	gesund	6,32	—	1,48	0,2	11. 12. 42
32 J.	Dr. L.	gesund	4,40	—	0,86	0,2	29. 12. 42
57 J.	E. F.	gesund	4,69	—	0,90	0,2	15. 12. 42
	id.	(nach U.-V.-Bestrahlung)	5,10	—	1,08	0,2	9. 1. 43
	id.		5,12	—	0,96	0,2	26. 2. 43
75 J.	Greisenblut		4,35	14,9	2,58	0,6	4. 3. 43
79 J.	Greisenblut		4,10	13,8	3,13	0,8	11. 2. 43
81 J.	Greisenblut		3,99	13,6	4,01	1,0	4. 3. 43
89 J.	Greisenblut		4,20	14,1	2,49	0,6	11. 2. 43

TAB. 2. Anämien.

Diagnose	Alter	Name	Erythrocyten Mill.	Hämoglobin g%	Reticulocyten ‰	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
Ikterus gravis, anämia congenita. Wiederholte Bluttransfusionen	3 M.	Voegele	3,50	9,9	—	2,81	0,8	10. 12. 42
Ikterus gravis Wiederholte Bluttransfusionen	4 W.	Harsch	3,07	11,2	37/200 Normobl.	4,19	1,4	6. 1. 43
Recidivierende Hirnblutung mit Krampfanfällen. Anämie	12 T.	Fröhlicher	2,35	8,5	—	3,17	1,3	5. 3. 43
Frühgeburtenanämie Wiederholte i. p. Bluttransfusionen	8 W.	Stettler	2,50	8,0	—	1,69	0,7	29. 12. 42

Diagnose	Alter	Name	Erythrocyten Mill.	Hämoglobin g%	Reticulocyten ‰	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
Unbehandelte fortschreitende Frühgeburtenanämie	6 W.	Kreienbühl	3,33	10,4	—	0,90	0,3	9. 2. 43
Gallengangatresie. Makrocytose und starke Anisocytose	6 W.	Franz	2,72	8,8	12 1/200 Normobl.	0,94	0,3	18. 12. 42
Posthämorrhag. hypochr. Anämie nach thrombopenischer od. thrombastenischer Erkrankung außerhalb der Klinik	10 J.	Ohnemus	3,28	10,9	—	2,66	0,8	15. 12. 42
Symptomat. Thrombopenie, Fibrinopenie auf allerg. Basis (Cibazol) Posthämorrhag. normochr. Anämie. 2 Bluttransfusionen	7 J.	Seiffert	3,56	11,5	—	2,87	0,8	27. 1. 43
Posthämorrhag. Anämie nach wiederholtem starkem Nasenbluten. Rachitis	1½ J.	Karrer, H.	1,91	4,5	49	1,42	0,7	3. 2. 43
Schwere hypochr. mikrocytäre Anämie bei familiärem hämolytischem Ikterus	3¾ J.	v. Arx	3,04	6,6	68	3,61	1,2	14. 1. 43
Postoperative Anämie nach Operation einer Hernia ing.	2 M.	Brugger	3,32	11,5	—	2,96	0,9	14. 1. 43
Zur Beobachtung wegen epilept. Anfällen Hypochrome Anämie	2 J.	Märki	5,61	9,9	9	2,80	0,5	11. 1. 43
Bronchitis und otitis media Leber- und Milztumor Hypochrome Anämie	1½ J.	Aebi	5,00	12,0	—	2,91	0,6	27. 1. 43

Diagnose	Alter	Name	Erythrocyten Mill.	Hämoglobin g%	Reticulocyten ‰	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
Lymphadenitis colli nach Grippe Hypochrome Anämie, starke Anisocytose	1½ J.	Schaub	4,70	7,7	—	3,66	0,8	16. 2. 43
Appendektomie 25. 12. 42 Bronchiolitis, Stomatitis. Infektiöse hypochrome Anämie	1½ J.	Schittly	4,39	10,2	—	2,85	0,6	9. 1. 43
Hilustbc. Hypochrome Anämie	1½ J.	Imhof	4,06	10,2	—	3,49	0,9	30. 12. 42
Empyem nach Pneumonie. Progrediente postinfektiöse Anämie	9 M.	Goy	4,02	11,2	—	2,39	0,6	12. 1. 43
Hämorrhagische Nephritis Hypochrome Anämie	2 J.	Hausammann	4,06	11,0	—	2,71	0,7	23. 2. 43
Aktive Tbc. pulmonum mit zunehmender sek. Anämie	5 M.	Grieser	A.3,87	9,2	—	2,59	0,7	4. 3. 43
Doppelversuch			B.3,73	9,8	—	2,13	0,6	4. 3. 43
Nierentumor und Nephrektomie am 6. 1. 43	9 M.	Rotzler	3,26	8,8	—	2,86	0,9	10. 3. 43
Hypochrome Anämie bei lobärer Pneumonie rechts und Exsudat	1½ J.	Probst	4,70	8,2	—	3,64	0,8	11. 3. 43
Aktive Lungentbc. mit sek. hypochromer Anämie	15 M.	Roth	4,24	9,2	—	3,60	0,8	18. 3. 43
Wochenbett-Anämie in Heilung	24 J.	Siggmann	4,87	9,9	—	2,95	0,6	18. 12. 42
Paramyeloblastenleukämie aleukämische Form	6 J.	Schweizer	2,15	5,4	13	0,58	0,3	25 2. 43

Diagnose	Alter	Name	Erythrocyten Mill.	Hämoglobin g%	Reticulocyten ‰	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
Congenital aplastische Anämie. Rückfall	4 J.	Hartmann	1,47	4,0	0	0	0	8. 12. 42
Nach wiederholten großen Transfusionen		id.	3,30	10,6	3	0,92	0,3	7. 1. 43
Heilung		id.	3,88	12,0	8	3,32	0,9	10. 3. 43
Frühgeburt 1900 g Wiederholte Bluttransfusionen	5 M.	Quenet	3,82	--	—	3,98	1,0	6. 1. 43
Abheilung der Anämie		id.	4,11	13,6	—	2,34	0,6	25. 2. 43
Bronchitis und Dyspepsie	2 M.	Hofer	3,33	11,4	—	0,83	0,2	7. 1. 43
Nach Ferro-Redoxon keine Besserung	3 M.	id.	3,94	11,8	—	1,34	0,3	10. 2. 43
Gebessert nach Hause entlassen	6 M.	id.	4,32	11,8	—	4,70	1,1	15. 5. 43
Lues congenita	9 W.	Jenny	1,51	5,7	—	2,46	1,6	26. 5. 43
Nach 2 großen Transfusionen	3½ M.	id.	3,40	9,8	—	2,98	0,9	30. 6. 43
Nach Spirocid-Behandlung u. Bluttransfusionen	5 M.	id.	4,54	12,5	3	2,90	0,6	20. 8. 43
Lues congenita unbehandelt	2½ M.	Küry	2,30	7,7	48	1,84	0,8	20. 8. 43
Nach Spirocid und Bluttransfusionen	6 M.	id.	4,33	11,3	17	2,03	0,5	1. 12. 43

TAB. 3. Leichte Anämien bzw. geheilte Anämien.

Diagnose	Alter	Name	Erythrocyten Mill.	Hämoglobin g%	Reticulocyten ‰	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Erythrocyt x 10^{-11} mg	Datum
Otitis media acuta Leichte normochrome Anämie in Heilung	7 M.	Karrer, P.	3,60	12,5	—	1,09	0,3	12. 1. 43
Hilustbc. und alte Scharlach-Nephritis Geheilte Anämie	9 J.	Frey	5,36	—	—	2,70	0,5	23. 2. 43
Anämie nach Magenresektion. Langdauernde Lebertherapie	Erwachsener	Fr.	3,94	14,7	—	1,70	0,4	25. 2. 43
Struma diffusa und Thymushyperplasie Myxödem Leichte hypochr. Anämie	8 M.	Klotz	5,06	11,5	—	3,17	0,6	24. 3. 43
Parenterale Dyspepsie in Rekonvaleszenz Leichte Anämie	7 W.	Löliger	3,29	11,2	—	2,22	0,7	2. 3. 43
Rekonvaleszenz nach Colitis. i. m. Blutinject. Leichte Anämie	4 M.	Gertiser	3,42	11,8	—	1,31	0,4	10. 12. 42

TAB. 4.

		intakte Erythrocyten		hämolysierte Erythrocyten			
Name	Erythrocyten Mill.	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Eryth. x 10 mg	P-Zunahme mg%	P-Zunahme pro Eryth. x 10 mg	Größere Zunahme mit hämolys. Eryth.	Datum
E. F.	5,12	0,96	0,2	4,83	0,9	4,5×	9. 3. 43
Hartmann	3,88	3,32	0,9	7,91	2,0	2,2×	10. 3. 43
Fröhlicher	2,20	3,17	1,3	4,92	2,2	1,7×	10. 3. 43
Nabelschnur	4,65	7,0	1,5	10,85	2,3	1,5×	11. 3. 43
		frisches Blut		2 Tage gestandenes Blut			
Handschin	4,35	2,28	0,5	6,45	1,5	3 ×	1. 3. 43

IV. Besprechung der Resultate.

Jäger fand, daß beim Menschen die Serum-Phosphatase gegenüber Glycerinmonophosphat am reichlichsten beim Säugling vorhanden sei, dann rasch abnehme, mit 25 Jahren ein Minimum erreiche und dann wieder ansteige. *Bodansky* hingegen konstatierte gegenüber Glycerindiphosphat eine kontinuierliche Abnahme mit steigendem Alter.

Unsere Bestimmungen der Erythrocyten-Phosphatase an nicht anämischen Patienten zeigen ein unverkennbares Absinken der Werte vom Neugeborenen zum Erwachsenen, um im hohen Greisenalter wieder anzusteigen. Versuche im Nabelschnurblut ergeben hohe Werte von $1{,}0—1{,}5 \times 10^{-11}$ mg Phosphor-Zunahme pro Erythrocyt. Auch in den ersten Lebenstagen sind die Werte noch sehr hoch, um dann in einigen Tagen rasch auf 0,8 abzusinken und nach 6—8 Wochen bereits Werte von 0,5—0,6 zu erreichen. Dann kann mit zunehmenden Lebensmonaten und -jahren wohl eine ganz langsame Abnahme der Enzymwerte konstatiert werden, die mit 12—13 Jahren $0{,}3—0{,}4 \times 10^{-11}$ mg Phosphor erreichen. Die Resultate bewegen sich dabei in ziemlich weiten Grenzen, und es wäre abzuklären, ob dies dadurch verursacht ist, daß wir verständlicherweise keine wirklich gesunden Kinder zur Verfügung hatten, oder ob die Fermentwerte von Individuum zu Individuum einfach verschieden sein können, was ja sehr wahrscheinlich ist. Eindeutig sind die niederen Werte von 0,2 (—0,3) im Erwachsenenalter. Im Greisenalter von über 70 Jahren werden wieder Werte von 0,6—1,0 gefunden.

Untersuchungen an den verschiedenartigsten Anämien ergaben augenfällige, jedoch sehr unterschiedliche Resultate.

Im allgemeinen erkennt man, daß Anämien mit starker Reaktion des Knochenmarks, wo sich der Organismus in guter Abwehr befindet oder durch geeignete Therapie zur Reaktion angefacht wurde, sehr hohe Phosphatase-Werte in der Größenordnung von Nabelschnur- und Neugeborenenblut aufweisen. Torpide Anämien hingegen, die therapeutisch schwer zu beeinflussen sind und monatelang stationär bleiben können, schwere Schädigungen und Aplasien des Knochenmarks, zeigen vor allem sehr niedere Ferment-Werte. Es könnte scheinen, daß die Phosphatase-Werte, ähnliche wie Polychromasie, Reticulocytenzahl und Sauerstoffzehrung des Blutes, ein Bild über die Regenerationsgröße des Knochenmarks geben könnten. Unsere wenigen Resultate und be-

sonders die sehr schwierige Abgrenzung der Norm lassen es jedoch noch nicht zu, über die Brauchbarkeit solcher Bestimmungen zu entscheiden. Es wäre sehr interessant, diesbezüglich das Verhalten der Phosphatase im Hochgebirge zu untersuchen.

In den Fällen, die wir über längere Zeit beobachten konnten, verhielt sich die Phosphatase im obigen Sinne:

Die schwere kongenital-aplastische Anämie (Hartmann, 4 J., Tab. 2) zeigte zunächst überhaupt keine Phosphor-Zunahme nach Inkubation im Brutschrank. Im peripheren Blut waren damals gar keine Reticulozyten zu finden, und das Knochenmark wies das Bild schwerer Aplasie des erythropoetischen Systems auf. Nach wiederholten großen Bluttransfusionen stieg der Koeffizient auf 0,3. Gleichzeitig tauchten Reticulocyten (3‰) im Blute auf. Mit dem kräftigen Ingangsetzen der Erythropoese und der damit verbundenen definitiven Heilung der Anämie stieg die Phosphor-Zunahme schließlich auf $0{,}9 \times 10^{-11}$ mg P pro Erythrocyt.

Umgekehrte Verhältnisse zeigt die Frühgeburtenanämie (Quenet, 4 Mt., Tab. 2), die zunächst unter starker Stimulation des Knochenmarks durch wiederholte Bluttransfusionen den Wert von $1{,}0 \times 10^{-11}$ mg P pro Erythrocyt aufwies. Die Abheilung der Anämie und die Rückkehr in normale regeneratorische Verhältnisse brachten ein Absinken auf $0{,}6 \times 10^{-11}$ mg P pro Erythrocyt zustande, was dem Alter von 6 Monaten ungefähr entspricht.

Recht eindrücklich sind die sehr niederen Phosphatase-Werte (0,2—0,3) bei einer hartnäckigen, infektiös und dyspeptisch bedingten Säuglingsanämie (Hofer, 2 Mt., Tab. 2), die sich zunächst auch mit großen Ferro-Redoxon-Dosen über lange Zeit nicht besserte. Als dann aber der Umschwung eintrat und die Anämie in Heilung überging, wurde der enorm hohe Koeffizient von 1,1 gefunden.

Es interessierte uns, zu untersuchen, inwieweit die *Struktur* der Erythrocyten auf die Phosphatasetätigkeit einen Einfluß habe. Wir machten neben der gewöhnlichen Phosphatase-Bestimmung Versuche mit hämolysierten, gewaschenen roten Blutkörperchen unter den gleichen Bedingungen. Die Resultate der hämolysierten Erythrocyten zeigen nun durchwegs eine ungleich größere Phosphor-Zunahme als die der intakten. Dort, wo die Phosphor-Zunahme unter den gewöhnlichen Bedingungen eine sehr große war, ist sie mit den zerstörten roten Blutkörperchen etwa doppelt so groß (1,5—2,2mal größer). Hingegen wird

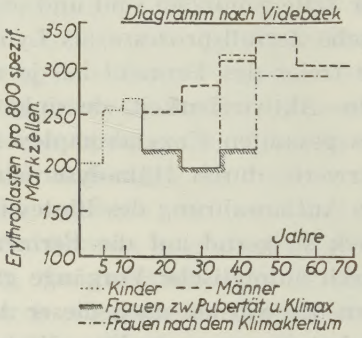
der Koeffizient 4,5mal mit Hämolysierten größer in Fällen, bei welchen mit Intakten ein kleiner Wert gefunden wurde. Wir vermuten daher, daß die gefundenen Unterschiede in den verschiedenen Altern bei Normalen und bei Anämien nicht auf verschiedenen Mengen von Phosphatase beruhen, sondern darauf, daß das Enzym mehr oder weniger fest an die Eiweißkörper der Zelle verankert und dadurch in seiner Aktivität mehr oder weniger frei ist bzw. mehr oder weniger gut an das Substrat herankommen kann. *Bamann* unterscheidet bei den Phosphatasen Desmo-Enzyme, die an kolloide Massen der Zelle gebunden sind und erst durch bestimmt gerichtete autolytische Zerfallsprozesse als Lyo-Enzyme losgelöst werden können. Je freier das Ferment ist, je mehr Lyo-Enzym, desto größer ist seine Aktivierbarkeit, sie sinkt mit zunehmender Molekulargröße des gesamten Enzymkomplexes. Außer der Steigerung der Umsatzwerte durch Hämolyse wirkt auch, wie erwähnt, eine längere Aufbewahrung des Blutes im Eisschrank vor Versuchsbeginn stark steigernd auf die Ferment-Werte. Es liegt sehr nahe, dies durch autolytische Vorgänge ganz im Sinne von *Bamann* zu erklären. Es würden nach dieser Auffassung bei der Erythrocyten-Phosphatase ganz analoge Verhältnisse vorliegen wie bei den Amylasen, bei welchen *Willstätter* ebenfalls die Trennung in Desmo-Enzym und Lyo-Enzym vorgenommen hat.

Macht man sich diese Auffassung zu eigen, so ist es sehr gut verständlich, daß die jugendliche Zelle mit ihrem lebhaften Stoffwechsel andere Verhältnisse zeigt als die ruhende Zelle. Wir verstehen, daß bei lebhafter regeneratorischer Marktätigkeit, bei der sich viele jugendliche Erythrocyten finden, die nicht voll ausgereiften Zellen durch die Besonderheiten ihres protoplasmatischen Aufbaus eine erhöhte Phosphataseaktion unter den gewählten Versuchsbedingungen aufweisen. Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als *Morawitz* und sein Schüler *Dennecke* wiederholt auf die verstärkte Sauerstoffzehrung von Blut bei stark regeneratorisch tätigem Knochenmark hingewiesen haben.

Die Verhältnisse im hohen Greisenalter, wo wieder ein Ansteigen der Phosphatase festgestellt wird, versuchen wir folgendermaßen zu erklären:

Videbaek, der normale Knochenmark-Punktate in verschiedenen Altersstufen untersuchte, kommt zu dem Resultat, daß die Erythroblasten mit zunehmendem Alter ansteigen. Die niederen

Werte des Verfassers im Kindesalter sind nach Angabe des Autors selbst statistisch nicht gesichert, da er an einer kleinen Zahl von Kindern beträchtliche Unterschiede konstatierte. Bei Frauen von 15—45 Jahren findet er interessanterweise viel niedrigere Erythroblastenzahlen als bei Männern im entsprechenden Alter. *Videbaek* vermutet, daß vielleicht die vermehrte Follikulinwirkung dabei eine Rolle spiele. Während bei Männern ein langsamer stetiger Anstieg erfolgt, erhöhen sich bei Frauen die Erythroblastenzahlen nach Eintritt des Klimakteriums sprunghaft.



Andererseits ist bekannt, daß das rote Knochenmark mit zunehmendem Alter vom Fettmark mehr und mehr verdrängt wird. Es wäre denkbar, daß das an Gesamtmasse verminderte erythropoetische Knochenmark im Alter eine gesteigerte regeneratorische Tätigkeit aufbringen muß, um keine Anämie entstehen zu lassen. In diesem Sinne würden die hohen Phosphatase-Werte im Greisenalter, bei nicht vorhandener Anämie, sprechen. Ein Unterschied ist allerdings bei der Alterskurve der Phosphatase der Blutkörperchen gegenüber der Verteilungskurve von *Videbaek* gegeben: die Phosphatasekurve steigt, soweit unser etwas geringes Material im Erwachsenenalter dies zu beurteilen erlaubt, im Greisenalter sprunghaft an, die Erythroblastenkurve aber stetig. Wir können vorläufig hierfür keine Erklärung abgeben.

Wir sind uns bewußt, daß diese Probleme noch nicht als endgültig gelöst angesehen werden dürfen, und daß vielleicht im einen oder andern Punkt eine Korrektur oder Ergänzung nötig wird.

V. Zusammenfassung.

1. Die unter möglichst natürlichen Verhältnissen gemessene Erythrocyten-Phosphatase, welche bei pH 6,8—7 auf zelleigenes

Substrat wirkt, ergibt Werte, die, auf gleiche Erythrocytenmenge bezogen, im Blut aus verschiedenen Lebensaltern eine Alterskurve zeigen.

2. Die Werte sind am höchsten im Nabelschnurblut und noch sehr hoch im Neugeborenenalter. Sie sinken dann rasch ab, liegen aber in der Kindheit noch höher als im Erwachsenenalter und steigen im hohen Greisenalter wieder bedeutend an.
3. Bei Anämien findet man meist erhöhte Werte, besonders wenn man Grund hat, eine lebhafte Regeneration anzunehmen. Bei darniederliegender Regeneration fehlt dieser Anstieg. Bei einem Fall von congenital-aplastischer Anämie wurden die tiefsten Werte gemessen.
4. Die gefundenen Unterschiede beruhen nicht auf solchen der Fermentmengen, sondern auf Verschiedenheiten der Ansprechbarkeit des an die Zellstruktur gebundenen Enzyms. In den jungen roten Blutkörperchen ist diese Bindung lockerer als bei voll ausgereiften. Aehnliches gilt für die Oxydo-Reduktasen; denn der Stoffwechsel der Jugendformen ist auch in anderer Hinsicht (O_2-Zehrung nach *Morawitz)* erhöht.
5. Nebenbei wurde gefunden, daß die Behauptungen von *O. Göbell* über Fehler in der Phosphatbestimmung nach den bisherigen anerkannten Methoden nicht zutreffen.

Summary.

The erythrocyte-phosphatase, measured as nearly as possible under natural conditions, gives values which related to the same number of erythrocytes show an age curve: in umbilical blood and the newly born the values are high, sink, however, quickly to increase again in old age. In anaemias with lively regeneration this increase is missing. An attempt is made to explain the differences found by the diversity of the sensitivity of the enzym bound to the cell structure (in the sense of *Willstätter).*

It was incidentally discovered that *O. Göbell*'s claim, concerning error in the determination of phosphate according to the recognised methods, is not valid.

Résumé.

Les dosages de la phosphatase érythrocytaire, pratiqués dans des conditions aussi naturelles que possible, donnent des valeurs qui, rapportées à une quantité constante d'érythrocytes, dessinent

une courbe en fonction de l'âge des sujets. Les taux sont élevés dans le sang du cordon ombilical et chez les nourrissons, pour s'abaisser ensuite rapidement, et s'élever de nouveau seulement chez les vieillards. Dans les anémies à régénération active on trouve des valeurs élevées, si la régénération est faible, cette élévation manque. L'auteur tente d'expliquer les différences observées par les variations de la réceptivité de l'enzyme lié à la structure cellulaire (dans le sens où l'entend *Willstätter).*

Accessoirement il fut constaté que les remarques de *O. Göbell* sur les erreurs dans le dosage du phosphore selon les méthodes connues actuellement sont sans fondement.

Literatur.

Bamann, zit. Oppenheim, Fermente, 6. Aufl. S. 133 und 150. — *Bodansky,* zit. Oppenheim, Fermente, S. 156. — *Dische,* Biochem. Z. 274, 51 (1934). — *Freudenberg,* Z. Kinderheilkunde, 57, 427 (1935). — *Göbell* und *Janda,* Z. Kinderheilkunde, 63, 524 (1942). — *Heilmeyer,* Handbuch d. inn. Med. Blutkrankheiten. — *Jäger,* zit. Oppenheim, Fermente, S. 156. — *Jost,* Hoppe-Seilers Z. 165, 171 (1927). — *Kinzel,* Z. Kinderheilkunde, 59, 160 (1938). — *Lohmann,* Biochem. Z. 194, 306 (1928). — *Morawitz* und *Dennecke,* zit. Heilmeyer, S. 29. — *Oppenheim,* Handbuch d. Fermente und ihrer Wirkungen, 6. Aufl. — *Roche,* zit. Oppenheim, Fermente, S. 141. — *Stearns* und *Warweg,* zit. Freudenberg, Z. Kinderheilkunde, 57, 427 (1935). — *Suntheim,* Z. Kinderheilkunde, 58, 54 (1936). — *Videbaek,* Folia haematologica, 65, 203 (1941). — *Waldschmidt-Leitz,* zit. Oppenheim, Fermente, S. 164. — *Willstätter,* zit. Oppenheim, Fermente, S. 400. — *Zeller* und *Strehler,* Verhandlungen d. Vereins d. Schw. Physiologen, Jan. 1942.